

刘树文,时功平. 不同形式无机碳对葛仙米的生理影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(3):166-169.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.03.043

不同形式无机碳对葛仙米的生理影响

刘树文,时功平

(贵州师范学院化学与生命科学学院,贵州贵阳 550018)

摘要:研究不同形式的无机碳(CO_2 、 Na_2CO_3 、 CO_2 和 Na_2CO_3)对葛仙米的生理影响。结果表明,当以 CO_2 和 Na_2CO_3 同时提供碳源时,葛仙米以叶绿素含量表示的生物量、比生长速率以及各种光合色素、可溶性蛋白和可溶性糖含量均高于以 CO_2 或 Na_2CO_3 单独提供碳源时的上述各项生理指标(Tukey's HSD, $P < 0.05$)。当以 CO_2 单独提供碳源时,葛仙米的上述各项生理指标均高于以 Na_2CO_3 单独提供碳源时的生理指标(Tukey's HSD, $P < 0.05$)。因此可知, CO_2 是葛仙米优先利用的无机碳形式,用 CO_2 和 Na_2CO_3 同时提供碳源时较适合葛仙米的人工养殖。

关键词:葛仙米;无机碳;生长;生理影响

中图分类号:S184

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2018)03-0166-04

葛仙米(*Nostoc sphaeroides* Kützinger)生长于水稻田中,生长期为11月至次年5月,在世界范围内其分布稀少,产量甚微(7.5 kg/hm²左右),除湖北省鹤峰县走马镇有约667 hm²分布外,在非洲仅有约0.73 hm²的葛仙米分布量^[1]。葛仙米是我国传统出口的一种珍贵野生的食药两用固氮蓝藻,其营养价值丰富,食用历史悠久^[1]。另外,其蛋白含量较高,含有丰富的人体必需的各种氨基酸、脂肪酸、维生素及矿物质,并且含有具有各种药用价值的多糖、色素等,此外,葛仙米还含有超氧化物歧化酶等生理活性物质^[2-3]。因此,葛仙米在保健食品、食品添加剂、动物饲料、医药、美容以及精细化加工品等领域具有广阔的开发应用前景^[1,4]。

陆生植物主要通过气孔吸收利用空气中的 CO_2 进行光合作用。 CO_2 、 HCO_3^- 和 CO_3^{2-} 在水体中能够通过如下反应进行相互转化: $\text{CO}_2 + \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{HCO}_3^-$, $\text{HCO}_3^- + \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{CO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O}$ ^[5]。水体中溶解的 CO_2 浓度远不能满足藻类的需求,水生蓝藻除了能够直接吸收利用溶解在水体中的 CO_2 以外,还可以通过二氧化碳浓缩机制(CO_2 concentrating mechanism,简称CCM)吸收利用水体中的 HCO_3^- ^[6]。蓝藻可通过细胞膜上的多种 HCO_3^- 转运蛋白将溶解在水体中的 HCO_3^- 转运至胞内,胞内的碳酸酐酶(carbonic anhydrase,简称CA)可催化 HCO_3^- 形成 CO_2 ,并且在核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(ribulose biphosphate carboxylase oxygenase,简称RubisCO)的作用下将 CO_2 固定生成3-磷酸甘油酸后参与细胞的各种代谢途径^[6]。

王思莹的研究表明,铜绿微囊藻可以直接或间接利用水体中的碳酸氢盐作为无机碳进行光合作用,无机碳浓度能影

响铜绿微囊藻的生长以及对氮磷的利用^[7]。缪晓玲等对海洋浮游藻无机碳利用机制的研究表明,在其指数期和静止期海洋浮游藻对无机碳的利用途径不同,指数期通过 HCO_3^- 直接吸收途径,静止期则是通过 CO_2 吸收途径^[8]。张君枝等研究了水体无机碳浓度升高对蓝绿藻生长、种群竞争的影响,结果表明,高浓度 CO_2 促进藻细胞结构中蛋白核的增大和藻细胞个体的增殖,细胞体积较小的藻类对 CO_2 浓度的响应更明显^[9]。刘继勇研究表明,食用蓝藻葛仙米能够直接利用 HCO_3^- 进行光合作用,通气培养的葛仙米具有多种 CO_2 、 HCO_3^- 转运子, Na^+ 依赖型 HCO_3^- 转运是葛仙米最主要的获取无机碳的方式^[10]。刘然等研究了不同浓度的 NaHCO_3 、 CO_2 对海洋单细胞微藻粉核油球藻(*Pinguicoccus pyrenoidosus* CCMP 2078)生长的影响,结果表明,适当提高 NaHCO_3 、 CO_2 浓度均能显著促进粉核油球藻的生长^[11]。郑洪立等研究表明,海洋小球藻(*Chlorella vulgaris* LICME001)能利用 Na_2CO_3 、 NaHCO_3 和 CO_2 产油,产油量随着3种形式无机碳浓度的增加先升高后降低,且 Na_2CO_3 、 NaHCO_3 较 CO_2 更有利于小球藻积累不饱和脂肪酸^[12]。

目前,葛仙米的人工养殖已经取得较大进展,但国内外对葛仙米的研究相对较少,对其开发利用也没有像小球藻(*Chlorella*)、螺旋藻(*Spirulina*)和盐藻(*Dunaliella*)那样已经实现产业化^[13]。葛仙米以其资源稀少、营养价值丰富、独特的生物活性和药理作用引起人们广泛的关注。葛仙米的人工养殖技术于2003年通过湖北省科技厅组织的科技成果鉴定,为早日实现葛仙米商业化培养奠定了坚实的基础^[14]。但是目前因为葛仙米的人工培养技术还存在产量较低等问题,还没有实现大规模的工厂化养殖^[13]。Chen等研究了磷对葛仙米生长和光合作用的影响^[15],文靖研究了钙对葛仙米生理生化特性的影响^[16]。本试验比较研究了人工养殖的葛仙米在以 CO_2 、 Na_2CO_3 单独提供碳源以及两者同时提供碳源($\text{CO}_2 + \text{Na}_2\text{CO}_3$)的培养条件下葛仙米的生理响应差异,以期寻找最适合葛仙米生长的无机碳形式,为葛仙米的人工养殖提供理论参考。

收稿日期:2016-09-25

基金项目:国家自然科学基金(编号:31660115);贵州省科技厅项目(编号:黔科合J字[2013]2243号);贵州师范学院博士项目(编号:12BS030)。

作者简介:刘树文(1980—),男,湖北黄冈人,博士,副教授,研究方向为藻类生理生化。E-mail:1059834578@qq.com。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

2015年4月,从贵州省岑巩县凯本乡沈家湾村水稻田中采集得到新鲜野生葛仙米球形群体。在实验室内将葛仙米球形体用无菌蒸馏水冲洗干净,再用75%乙醇溶液浸泡30 s,去除杂藻,然后用无菌BG11₀(无氮的BG11培养基)培养液清洗3次,再放入与葛仙米群体质量相同的培养液,用玻璃匀浆器匀浆成丝状藻浆。将丝状藻浆用BG11₀培养液稀释,在温度约为23℃、光照度约为1 000 lx的条件下通入空气进行培养。经过15 d培养后得到无杂菌、杂藻的贵州野生葛仙米藻种。

1.2 培养条件

配制BG11₀培养基(含0.02 g/L Na₂CO₃,不含NaNO₃)以及不含Na₂CO₃的BG11₀培养基(不含NaNO₃),BG11₀培养基和不含Na₂CO₃的BG11₀培养基用0.5 mol/L NaOH、HCl将pH值调至7.0。将配制好的培养基在121℃、1.05 kg/cm²下灭菌30 min。藻种经过匀浆后分别接种到9个经过高压灭菌的500 mL锥形瓶中,其中6瓶加入BG11₀培养基,另外3瓶加入不含Na₂CO₃的BG11₀培养基,每瓶藻液的总体积为400 mL。将试验分为3个组进行培养,用空气泵通入经0.22 μm滤膜过滤的无菌空气,通气量为300 mL/min。第1组由空气中的CO₂和培养液中的Na₂CO₃同时提供碳源,第2组由空气中的CO₂单独提供碳源(BG11₀不含Na₂CO₃),第3组由Na₂CO₃单独提供碳源(采用高浓度的NaOH溶液及饱和的澄清石灰水组成的CO₂过滤装置将空气中的CO₂去除)。每组设置3个重复,培养温度为26℃,用30 W日光灯进行光照,光照度通过照度计测定,培养光照度为1 500 lx,每组设3个重复,经过8 d光照培养后取3个组的藻样测定各项生理指标。

1.3 比生长速率的测定

从9个锥形瓶中各取藻液20 mL,离心30 min,倒掉上清液,加入3 mL 95%乙醇,振荡,放入4℃冰箱中24 h。4 000 r/min离心30 min后取上清液,用分光光度计测定D_{665 nm}和D_{649 nm}。叶绿素a(chlorophyll a,简称Chla)含量依据下列公式计算^[17]: $C_{Chla} = 13.95D_{665 nm} - 6.88D_{649 nm}$ 。比生长速率(μ)依据下列公式计算: $\mu = (\ln X_1 - \ln X_2) / (T_2 - T_1)$ 。式中: X_1 、 X_2 分别是 T_1 (初始)、 T_2 (第8天)时的叶绿素a含量。

1.4 各种光合色素含量的测定

从各组葛仙米培养瓶中各取20 mL藻液,4 000 r/min离心30 min,倒掉上清液,加入4 mL 95%乙醇,于4℃冰箱中放置24 h,于4 000 r/min离心30 min,取上清液,用分光光度计分别在波长665、649、470 nm下测定其吸光度。叶绿素a和类胡萝卜素(carotenoids,简称Car)含量(葛仙米是蓝藻,因此不含叶绿素b)依据下列公式计算^[17]: $C_{Chla} = 13.95D_{665 nm} - 6.88D_{649 nm}$; $C_{Car} = 1 000D_{470 nm} - 2.05C_{Chla} - 114.8C_{Chlb}$ 。

从各组葛仙米培养瓶中各取20 mL藻液,4 000 r/min离心30 min,去上清,各加入4 mL 0.1 mol/L pH值7.0的磷酸缓冲液,冰浴匀浆90次,于4 000 r/min离心30 min。取上清,用分光光度计分别测定上清液在562、615、652 nm波长下

的吸光度 $D_{562 nm}$ 、 $D_{615 nm}$ 、 $D_{652 nm}$ 。藻蓝蛋白(phycoyanin,简称PC)、别藻蓝蛋白(allophycocyanin,简称APC)和藻红蛋白(phycoerythrin,简称PE)的含量根据Siegelman等的方法计算^[18]: $C_{PC}(\text{mg/mL}) = (D_{615 nm} - 0.474D_{652 nm}) / 5.34$; $C_{APC}(\text{mg/mL}) = (D_{652 nm} - 0.208D_{615 nm}) / 5.09$; $C_{PE}(\text{mg/mL}) = (D_{562 nm} - 2.41C_{PC} - 0.849C_{APC}) / 9.62$ 。

1.5 蛋白质含量的测定

从各组葛仙米培养瓶中各取20 mL藻液,于4 000 r/min离心30 min,去上清,各加入4 mL 0.1 mol/L pH值7.0的磷酸缓冲液,冰浴匀浆90次,于4 000 r/min离心30 min。上清液中蛋白质含量依据考马斯蓝法测定^[17]。

1.6 可溶性糖含量的测定

从各组葛仙米培养瓶中各取20 mL藻液,于4 000 r/min离心30 min,去上清,各加入4 mL蒸馏水,冰浴匀浆90次,4 000 r/min离心30 min。上清液中可溶性糖含量依据蒽酮试剂法测定^[17]。

1.7 统计分析

本研究主要用软件Origin 8.0作图,用STATISTICA[®] 7.0进行统计分析处理。用单因素方差分析(ANOVA)和Tukey显著性检验(HSD)来分析不同处理间的显著性水平。正态分布和方差同质性分析分别采用Lilliefors检验和Levene检验。

2 结果与分析

2.1 不同形式无机碳培养条件下葛仙米的生长情况

图1表明,葛仙米分别在含有CO₂ + Na₂CO₃、CO₂、Na₂CO₃不同形式的无机碳培养基中培养8 d后,以叶绿素浓度表示的生物量分别增加到初始值的7.4、6.4、3.6倍。表1表明,分别用CO₂、Na₂CO₃提供碳源时,葛仙米的比生长速率分别降低到CO₂、Na₂CO₃同时提供碳源时的93.2%、57.4%。以CO₂和Na₂CO₃同时作为碳源时,葛仙米培养2~8 d的生物量(以叶绿素a含量表示)分别高于以Na₂CO₃或CO₂单独作为碳源时葛仙米的生物量(图1),其比生长速率也显著高于以Na₂CO₃或CO₂单独作为碳源时葛仙米的比生长速率(Tukey's HSD, $P < 0.05$) (表1)。以CO₂单独作为碳源时,葛仙米培养2~8 d的生物量分别高于以Na₂CO₃单独作为碳源时葛仙米的生物量(图1),其比生长速率也显著高于Na₂CO₃单独作为碳源时葛仙米的比生长速率(Tukey's HSD, $P < 0.05$) (表1)。

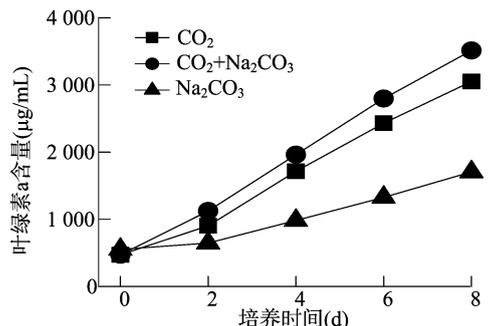


图1 葛仙米在不同形式的无机碳条件下的生长曲线

表1 不同形式无机碳培养条件下葛仙米的比生长速率

碳源	比生长速率
CO ₂ + Na ₂ CO ₃	0.251 ± 0.019a
CO ₂	0.234 ± 0.015b
Na ₂ CO ₃	0.144 ± 0.035c

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下表同。

2.2 不同形式无机碳培养条件下葛仙米各种光合色素含量的变化

在不同形式的无机碳培养条件下,葛仙米的PC、APC、PE含量以及Chla、Car含量分别见表2和表3。可以看出,以CO₂单独提供碳源时,葛仙米的PC、APC、PE、Chla、Car含量分别降低到CO₂、Na₂CO₃同时提供碳源时的63.01%、38.66%、78.99%、79.89%、90.98%。以Na₂CO₃单独提供碳源时,葛仙米的PC、APC、PE、Chla、Car含量分别降低到CO₂、Na₂CO₃同时提供碳源时的50.87%、26.80%、41.89%、50.68%、53.45%。以CO₂单独作为碳源时,葛仙米的各种光合色素含量显著高于以Na₂CO₃单独作为碳源时葛仙米的各种光合色素含量(Tukey's HSD, $P < 0.05$)。可以看出,不同形式无机碳对葛仙米的藻红蛋白影响最大,对葛仙米的叶绿素、类胡萝卜素影响较小。

表2 不同形式无机碳源培养条件下葛仙米的PC、APC、PE含量

碳源	PC含量 ($\mu\text{g/mL}$)	APC含量 ($\mu\text{g/mL}$)	PE含量 ($\mu\text{g/mL}$)
CO ₂ + Na ₂ CO ₃	1.73 ± 0.14a	1.94 ± 0.20a	7.95 ± 0.36a
CO ₂	1.09 ± 0.09b	0.75 ± 0.11b	6.24 ± 0.33b
Na ₂ CO ₃	0.88 ± 0.01c	0.52 ± 0.08c	3.33 ± 0.35c

表3 不同形式无机碳源培养条件下葛仙米的Chla和Car含量

碳源	Chla含量 ($\mu\text{g/mL}$)	Car含量 ($\mu\text{g/mL}$)
CO ₂ + Na ₂ CO ₃	12 801.93 ± 14.05a	2 896.96 ± 4.02a
CO ₂	10 227.55 ± 8.33b	2 635.51 ± 6.17b
Na ₂ CO ₃	6 488.46 ± 18.74c	1 548.47 ± 8.37c

2.3 不同形式无机碳培养条件下葛仙米可溶性蛋白含量的变化

图2为蛋白质含量标准曲线,其直线方程为 $y = 0.006x + 0.043$ ($r^2 = 0.979$)。根据直线方程计算得到不同形式无机碳源培养下葛仙米可溶性蛋白含量,由图3可以看出,当CO₂、Na₂CO₃同时作为碳源时,葛仙米的可溶性蛋白含量最高(Tukey's HSD, $P < 0.05$)。当葛仙米的培养分别以CO₂、

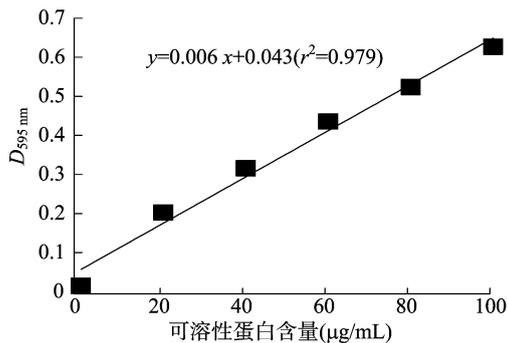
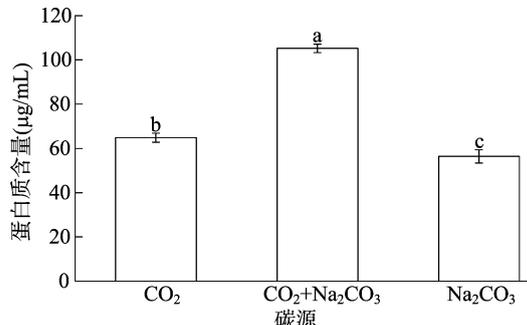


图2 蛋白质标准曲线



不同处理间标有不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。图5同

图3 葛仙米在不同无机碳下的蛋白质含量

Na₂CO₃单独提供碳源时,葛仙米的可溶性蛋白含量分别降低到两者同时提供碳源时的62.5%、55.6%(Tukey's HSD, $P < 0.05$)。以CO₂单独作为碳源培养时,葛仙米的可溶性蛋白含量显著高于以Na₂CO₃单独作为碳源时葛仙米的可溶性蛋白含量(Tukey's HSD, $P < 0.05$)。

2.4 不同形式无机碳培养条件下葛仙米可溶性糖含量的变化

图4为可溶性糖标准曲线,其直线方程为 $y = 0.005x - 0.018$ ($r^2 = 0.989$)。根据直线方程计算得到不同形式的无机碳源培养下葛仙米可溶性糖含量如图5所示。当以CO₂和Na₂CO₃同时作为碳源时,葛仙米的可溶性糖含量最高(Tukey's HSD, $P < 0.05$)。当葛仙米的培养分别以CO₂、Na₂CO₃单独提供碳源时,葛仙米的可溶性糖含量均分别降低到两者同时提供碳源时的71.4%、47.6%(Tukey's HSD, $P < 0.05$)。以CO₂单独作为碳源时,葛仙米的可溶性糖含量显著高于以Na₂CO₃单独作为碳源时葛仙米的可溶性糖含量(Tukey's HSD, $P < 0.05$)。

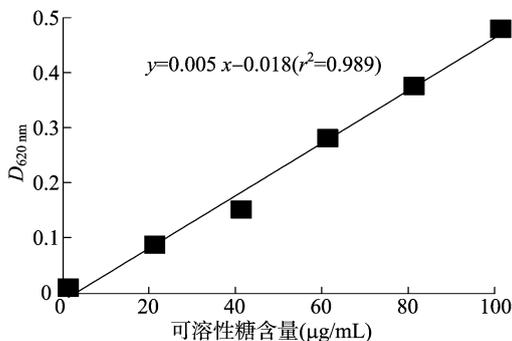


图4 可溶性糖标准曲线

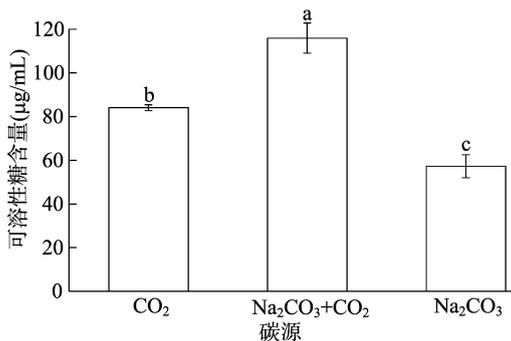


图5 葛仙米在不同无机碳下的可溶性糖含量

3 讨论与结论

以 CO_2 单独作为碳源时,葛仙米的以叶绿素含量表示的生物量、比生长速率以及叶绿素、类胡萝卜素、藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、可溶性糖及可溶性蛋白含量大都显著高于以 Na_2CO_3 单独作为碳源时葛仙米的上述各项生理指标 (Tukey's HSD, $P < 0.05$)。由此可见, CO_2 是葛仙米优先利用的无机碳形式。 CO_3^{2-} 在培养液中需要通过水解作用转化为 HCO_3^- 而被葛仙米作为碳源吸收利用,而培养液中溶解的 CO_2 可以被藻细胞直接吸收利用^[6]。根据藻类的 CO_2 浓缩机制,由于 CO_2 的转运不消耗能力,因此在多种碳源中藻类更倾向于吸收水中的溶解 CO_2 ^[19]。水体中溶解的 CO_2 升高,减少了藻细胞对 HCO_3^- 的转运,节省了更多的能量,更有利于藻细胞的生长^[9]。郭琪等研究表明,提高 CO_2 浓度较大幅度地提高了栅藻的碳固定速率和油脂积累^[20]。今后我们将进一步探讨不同浓度的 CO_2 对葛仙米的生理影响,探讨增加葛仙米产量的更加优化的培养条件。

虽然以 Na_2CO_3 单独作为碳源时,对葛仙米的生长促进作用较小,但在含有 Na_2CO_3 的 BG11₀ 培养液中通入含有 CO_2 的空气,能最大程度地促进葛仙米的生长。 CO_3^{2-} 在培养液中不仅能通过水解转化为 HCO_3^- 而被葛仙米作为碳源吸收利用,而且具有调节培养液 pH 值的作用。在一定范围内,培养液的 pH 值越高, CO_2 的利用率也越高^[14]。不同藻类有不同的最适 pH 值^[21],藻类在吸收利用水体中溶解的无机碳时,会造成水体中 pH 值升高,过高的 pH 值会影响葛仙米藻细胞对铁等微量元素的吸收利用,继而影响藻细胞的生长^[22]。向含有 Na_2CO_3 的培养液中通入含有 CO_2 的空气,能使培养液过高的 pH 值适当降低^[14]。由于不同的无机碳形式对培养液 pH 值的影响不同, pH 值也会影响葛仙米藻细胞对无机碳的利用。因此本研究在配制培养液时用 0.5 mol/L NaOH 和 HCl 将各种培养液的初始 pH 值调至 7.0^[12]。但葛仙米藻细胞在生长过程中 pH 值会不断变化,今后应该进一步研究固定 pH 值下各种形式无机碳对葛仙米生长的影响。

与 CO_2 和 Na_2CO_3 同时提供碳源时相比, CO_2 或 Na_2CO_3 单独提供碳源时,葛仙米的以叶绿素含量表示的生物量、比生长速率以及叶绿素、类胡萝卜素、藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、可溶性糖、可溶性蛋白含量均有不同程度的降低 (Tukey's HSD, $P < 0.05$)。因此在葛仙米的人工养殖过程中,除了应该在培养液中加入 Na_2CO_3 作为葛仙米的碳源,同时应该通入含有 CO_2 的空气,才能使葛仙米保持最佳生长状态,提高葛仙米的产量和品质。

参考文献:

[1] 陈德文,汪兴平,潘思轶. 葛仙米的研究现状及应用前景[J]. 食品科学,2003,24(11):153-156.
[2] 刘金龙. 葛仙米营养成分研究[J]. 中草药,2000,31(11):862-

863.
[3] 夏建荣,高坤山. 球形念珠藻的生化组成分析[J]. 武汉植物学研究,2002,20(3):223-224.
[4] 毕永红,胡征宇. 葛仙米的营养价值及其开发利用[J]. 中国野生植物资源,2004,23(1):40-42.
[5] 岳国峰. 藻类无机碳营养的研究进展(II)——藻类利用无机碳的机理及其调节[J]. 海洋科学,2003,27(6):31-34.
[6] Giordano M, Beardall J, Raven J A. CO_2 concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution [J]. Annual Review of Plant Biology,2005,56(1):99-131.
[7] 王思莹. 无机碳对铜绿微囊藻生长特性的影响研究[D]. 北京:北京建筑大学,2015.
[8] 缪晓玲,Merrett M J. 海洋浮游藻 (*Emiliania huxleyi*) 无机碳利用机理[J]. 上海师范大学学报(自然科学版),1998,27(4):44-48.
[9] 张君枝,王齐,马文林,等. 水体无机碳升高对蓝绿藻生长和种群竞争的影响研究进展[J]. 生态环境学报,2015,24(7):1245-1252.
[10] 刘继勇. 食用蓝藻葛仙米的二氧化碳浓缩机制及其生理生态学研究[D]. 武汉:华中师范大学,2004.
[11] 刘然,刘晓娟,王铭,等. 不同无机碳源对粉核油球藻生长的影响[J]. 生态科学,2007,26(3):227-231.
[12] 郑洪立,高振,张齐,等. 无机碳源对小球藻自养产油脂的影响[J]. 生物工程学报,2011,27(3):436-444.
[13] 田志环,焦传珍. 葛仙米研究现状及其开发前景[J]. 食品研究与开发,2007,28(2):170-172.
[14] 邓中洋. 葛仙米、地木耳的大量培养及葛仙米形态生理特征研究[D]. 武汉:中国科学院水生生物研究所,2006.
[15] Chen Z, Chen S, Lu G, et al. Phosphorus limitation for the colony formation, growth and photosynthesis of an edible cyanobacterium, *Nostoc sphaeroides* [J]. Biotechnology Letters,2012,34(1):137-143.
[16] 文靖. 不同钙浓度对葛仙米生理生化特性的影响[D]. 武汉:湖北工业大学,2014.
[17] 张志良,翟伟菁,李小方. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,2009:118-119.
[18] Siegelman H W, Kycia J H. Algal biliproteins[M]//Hellebust J A, Craigie J S. Handbook of phycological methods: physiological and biochemical methods. Cambridge: Cambridge University Press, 1978:71-79.
[19] 赵旭辉,孔繁翔,谢薇薇,等. 全球 CO_2 水平升高对浮游植物生理和生态影响的研究进展[J]. 生态学报,2012,32(21):6880-6891.
[20] 郭琪,郑凌凌,沈伟,等. 不同二氧化碳浓度培养对两株栅藻碳固定速率及油脂积累的影响[J]. 水生生物学报,2016,40(2):414-418.
[21] 刘春光,金相灿,孙凌,等. pH 值对淡水藻类生长和种类变化的影响[J]. 农业环境科学学报,2005,24(2):294-298.
[22] 程超,莫开菊,汪兴平. 葛仙米生长及繁殖条件的探讨[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版),2003,21(4):14-17.